VERGLEICHENDE QUANTITATIVE ÖSTROGEN-BESTIMMUNGEN IM HARN NACH BROWN UND NACH ITTRICH BEI DER OVARIALSTIMULIERUNG MIT HYPOPHYSÄREM FSH UND HCG

HANS DWORZAK

1968

AUS DER I.FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr.W.Bickenbach

VERGLEICHENDE QUANTITATIVE ÖSTROGENBESTIMMUNGEN IM HARN NACH B R O W N UND NACH I T T R I C H BEI DER OVARIALSTIMULIERUNG MIT HYPOPHYSÄREM FSH UND HCG.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans Dworzak
aus München

1 9 6 8

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München:

Referent:	Prof.Dr.R. Kaiser
Correferent:	Prof.Dr.W. Bickenbach
Dekan:	Prof.Dr.F. Marguth
Tag d.mündl. Prüfung:	2o.12.1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

- Dem Andenken meines Vaters gewidmet -

Inhaltsverzeichnis

A. Allgemeiner Teil

1. Einleitung und Problemstellung
2. Die Östrogene
   a) Entdeckung, chem.Eigenschaften, Bildungsstätten
   b) Stoffwechsel und Ausscheidung der Östrogene
   c) Die Östrogene im ovulatorischen Zyklus der Frau
   d) Die Östrogene im anovulatorischen Zyklus und bei Amenorrhoe
   e) Die Östrogenausscheidung bei Gonadotropinkuren
3. Die quantitative Bestimmung der Östrogene im Harn
   a) Die Methode von BROWN
   b) Drei Methoden von ITTRICH aus den Jahren 1958 - 1960
   c) Methode zur Schnellbestimmung des Östriols (ITTRICH, pers.Mittlg. 1966)

B. Spezieller Teil

1. Spezielle Aufgabenstellung
2. Material und Methodiken
   Bestimmungsmethoden der Östrogene
   a) Bestimmung von Östron, Östradiol und Östriol aus dem menschlichen Harn nach BROWN
   b) Bestimmung von Östriol aus dem menschlichen Harn nach ITTRICH (pers.Mittlg. 1966)
3. Ergebnisse
   a) Wiedergewinnungsversuche, Angaben über Erfahrungen mit den Methoden
   b) Vergleichswerte beider Methoden
4. Diskussion der Ergebnisse
5. Zusammenfassung

C. Literaturverzeichnis

A. Allgemeiner Teil

1. Einleitung und Problemstellung.

Die Auslösung der Ovulation wird seit der Einführung der hypophysären Gonadotropine in die Therapie - GEMZELL (33), BETTENDORF (5), BUXTON und HERRMANN (17) u.a. - wesentlich zuverlässiger erreicht als mit PMS und HCG (6,35,58) oder Ovarialhormonen (51,13, 54). Das Clomiphen hat sich auch als gut wirksam erwiesen (26, 61),jedoch wird von ihm angenommen, daß es seine Wirkung nur entfalten kann, wenn ein leistungsfähiges Hypophysen - Zwischenhirnsystem vorhanden ist. Mit der Einführung der hypophysären Gonadotropine und des Clomiphens in die Therapie traten jedoch auch Nebenwirkungen in den Vordergrund, die bei der zuvor praktizierten Verwendung von PMS und HCG in seltenen Fällen schon aufgetreten waren und deshalb bisher keine größere Bedeutung hatten (50,33,57,41,42).

Es handelt sich einmal um die Bildung von großen Ovarialzysten, die bis zum Bild des akuten Abdomens bzw. des Meigs-Syndroms (8,36) führen können und die Gefahr der Ruptur mit innerer Verblutung beinhalten; zum anderen liegt die Rate der Mehrlingsschwangerschaften wesentlich höher als bei Spontanovulationen. Bei den Mehrlingen handelt es sich nicht nur um Zwillinge und Drillinge, sondern auch um Vier-, Fünf-, Sechs- und Siebenlingsschwangerschaften, die freilich meist vorzeitig als Aborte oder Frühgeburten enden (48,49,32,20).

Um diese Nebenwirkungen der Gonadotropinkuren zu verhindern, wäre es folgerichtig,die Dosierung der hypophysären Gonadotropine zu verringern. Nach BETTENDORF (9) reagiert das Ovar jedoch augenscheinlich mit einem Alles-oder-Nichts-Gesetz (d.h. entweder sprechen die Ovarien bei

einer niedrigeren Dosis überhaupt nicht an oder bei nur ganz gering erhöhter Dosierung, die erforderlich ist , um überhaupt einen Effekt zu erzielen, werden bereits Zysten und Siebenlingsschwangerschaften beobachtet). Die Gonadotropine bezüglich der FSH-LH-Relation 'physiologischer' zu gestalten, ist zur Zeit noch nicht möglich, einmal, weil keine reinen FSH- oder LH-Präparate zur Verfügung stehen,die man entsprechend kombinieren könnte, zum anderen, weil die FSH-LH-Relationen im normalen Ovulationszyklus unterschiedlich angegeben werden (2,14,43).

So gibt es Angaben über eine gleichsinnige FSH-LH-Ausscheidung mit einem Gipfel um die Ovulation (14, SCHMIDT-ELMENDORFF) und über eine gegensinnige FSH-LH-Ausscheidung mit einem LH-Gipfel und FSH-Tief um die Ovulation bei hohen Werten des FSH am Zyklusanfang und -ende (4, FUKUSHIMA 30). Nach diesen Befunden würden sich die FSH-LH-Relationen im Zyklus täglich ändern.

Von CROOKE (21) wurde versucht,mit ansteigenden Gonadotropindosen probeweise die Ovarien zur Östrogensynthese zu stimulieren, d.h. die effektive Dosis zu ermitteln und mit dieser dann täglich zu behandeln. Doch ist auch dieses Vorgehen nicht frei von Nebenwirkungen (19). Im übrigen liegen Beobachtungen vor, die sowohl BETTENDORF (6,7), CROOKE (21) als auch DAUME (Pers.Mittlg.)gemacht haben, daß nicht nur bei verschiedenen Frauen individuelle Unterschiede bestehen, sondern selbst bei ein und derselben Frau die Ansprechbarkeit der Ovarien zu verschiedenen Zeiten sehr unterschiedlich sein kann.

Anhand von sechs Gonadotropinkuren zur Ovulationsauslösung, die zu Schwangerschaften geführt haben, konnten DAUME und KAISER beobachten, daß unmittelbar vor dem Basaltemperaturanstieg gemessene Östrogenausscheidungen bei einer Einzelschwangerschaft im Normbereich lagen, bei einer Zwillingsschwangerschaft verdoppelt waren und bei einer Fünf- und Sechslingsschwangerschaft eine excessive Steigerung erfuhren (über 300 γ - 1 mg). GEMZELL (32)gibt 'zur Zeit der Konzeption' höhere Werte an.

Auf Grund dieser Beobachtung wurde die Vermutung geäußert, daß hier eine Möglichkeit liegen könnte, durch Östrogenschnellbestimmungen excessive präovulatorische Hormonsteigerungen und damit die Gefahr von Polyovulationen so rechtzeitig zu erkennen, daß in dem betreffenden Zyklus durch Konzeptionsverhütung die Entstehung einer Mehrlingsschwangerschaft verhindert werden kann.

Qualitative Östrogenbestimmungen wurden bisher meist nach der sehr genauen Methode nach BROWN (10) durchgeführt, die allerdings relativ viel Zeit beansprucht. ITTRICH entwickelte eine fluorimetrische Schnellbestimmung von Östriol im Harn (pers. Mitteilung ITTRICH-DAUME), der die Mängel seiner früheren fluorimetrischen Methoden nicht mehr anhaften sollen.

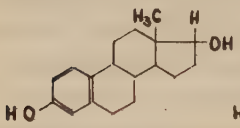
Um nun nachzuprüfen, ob die Methode - unter Inkaufnahme gewisser Ungenauigkeiten- so exakt arbeitet, daß die gewonnenen Werte für die eingangs erwähnte klinische Fragestellung verläßlich sind, sollten in dieser Arbeit bei Gonadotropinkuren amenorrhoischer Frauen die Östrogene einmal fluorimetrisch nach Angaben von ITTRICH und im Vergleich dazu mit der BROWN'schen Methode bestimmt werden. Dieses aufwendige Verfahren der Überwachung von Gonadotropinkuren ist nötig, da nach den bisherigen Erfahrungen andere Merkmale, die ein Ansteigen des Östrogenspiegels erkennen lassen - wie die Proliferation des Vaginalepithels, die Spinnbarkeit des Zervikalschleimes und der Anstieg der Basaltemperatur - wohl gute qualitative Indikatoren sind, jedoch keine Rückschlüsse auf die quantitativen Verhältnisse zulassen.

2. Die Östrogene

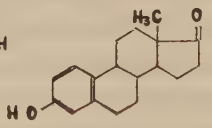
a) Entdeckung, chem.Eigenschaften, Bildungsstätten

1929 gelang es BUTENANDT (15,16), wie auch DOISY und Mitarbeitern (27),aus Schwangerenharn die erste östrogene Substanz, das Östron, zu gewinnen. In den 30-er Jahren wurden Östriol und Östradiol isoliert,sowie das Equilin und Equilenin aus dem Harn trächtiger Stuten gewonnen.

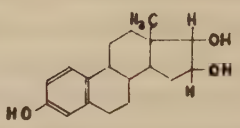
Die menschlichen, körpereigenen Östrogene gehören in die Gruppe der Steroidhormone, sie sind im Wasser unlöslich, aber in organischen Lösungsmitteln gut löslich. Physikalisch erweisen sie sich als sehr stabil. Von praktischer klinischer Bedeutung sind die drei klassischen Östrogene: Östron, 17-ß-Östradiol und Östriol:



17-ß-Östradiol



Östron



Östriol

Außer diesen drei Östrogenen wurden bis heute etwa 20 weitere entdeckt (48). Sie sind jedoch nur in geringerer Menge im Organismus vorhanden und bislang ohne größere klinische Bedeutung.

Östrogenbildungsstätten sind außerhalb der Schwangerschaft hauptsächlich die Ovarien.Dabei stellten DOISY und andere (27) eine Östrogenproduktion in den Follikelzellen der Theca interna fest, DWORZAK und PODLESCHKA (28) am Falle eines Granulosazelltumors die Östrogenbildung in den Granulosazellen,WESTMAN (60) u.a. in den interstitiellen Zellen des Ovars. Daneben entstehen Östrogene in der Nebennierenrinde und durch den Umbau

anderer Hormone. Östrogene kommen in Moorwasser vor; mit der Nahrung werden ebenfalls geringe Östrogenmengen aufgenommen.

b) Stoffwechsel und Ausscheidung der Östrogene.

Der Organismus vermag Östrogene teils durch den Umbau von Cholesterin zu gewinnen, teils auch (besonders im Ovar) durch die Biosynthese aus Acetatresten. Zuerst entstehen Östradiol und Östron, aus diesen das Östriol. Die Umwandlung des Östradiols in Östron ist reversibel. Östriol kann aber nicht in Östron umgebaut werden:

Östradiol ⇄ Östron ⟶ Östriol

Im Blut wird die östrogene Aktivität an die Globulinfraktion des Plasmas gebunden. - Die Östrogene haben eine allgemein anabole Wirkung, die besonders das genitale Wachstum betrifft. Neben zahlreichen anderen Eigenschaften sei der Einfluß auf den Wasser- und Mineralstoffwechsel und die Fermentaktivitäten erwähnt. Ihre biochemische Wirkungsweise kann aber noch nicht sicher erklärt werden (45). Die Inaktivierung erfolgt - wie bei allen Phenolsteroiden - in der Leber. Sie werden durch Koppelung an Glucuronsäure bezw. an Schwefelsäure als Ester im Stuhl und Urin ausgeschieden.

Bereits in der Kindheit ist bei beiden Geschlechtern eine geringe Östrogenausscheidung nachweisbar. Mit Beginn der Pubertät steigt diese, besonders beim Mädchen, erheblich an und erreicht bei der geschlechtsreifen Frau eine monatliche Ausscheidungsmenge von durchschnittlich 5 mg (47).

Quantitativ verhält sich dabei

Östradiol : Östron = 1 : 2 und
Östradiol + Östron : Östriol = 1 : 1

ITTRICH zeigte, daß die Östrogene etwa einen Tag nach dem Auftreten im Blut im Urin ausgeschieden werden (40).

c) Die Östrogene im ovulatorischen Zyklus der Frau

Der weibliche Zyklus wird in die Profilerations- und die Sekretionsphase unterteilt. Während des ersten Drittels des Zyklus sind die Östrogenwerte niedrig, vom 7. bis 8.Tag an setzt parallel dem Heranwachsen eines Follikels ein stetiger Anstieg der drei Östrogene ein; sein Maximum ist am 13. oder 14.Tag und fällt zeitlich mit der Ovulation zusammen. Die Basaltemperatur erreicht dabei ihren Tiefstpunkt und steigt danach um einige Zehntelgrade an. Östriol erreicht sein Ovulationsmaximum einen Tag später als Östron und Östradiol, da sein Aufbau ja aus diesen erfolgt ('Östriol-lag').

KAISER und Mitarb. (44) untersuchten die zeitliche Korrelation der Östrogen - und Gonadotropinmaxima und stellten fest,daß beide Hormongruppen kurz vor dem Ansteigen der Basaltemperatur ihre höchste Ausscheidung erfahren. Die Gonadotropinaktivität steigt demnach in direkter zeitlicher Abstimmung zur Östrogenausscheidung. PETERSOHN (53) und BROWN (11) bestätigen diese Untersuchung; BELL (4) kann keine Parallelität in der Ausscheidung beider Hormongruppen erkennen.

Nach der Ovulation fallen die Werte aller Östrogene kurzzeitig ab (wobei es gelegentlich zu einer geringgradigen Entzugsblutung, der 'Mittelblutung', kommen kann), zeigen aber bald einen zweiten kleinen Anstieg, der in ein 'Plateau' ausläuft, welches durch die Östrogenproduktion des corpus luteum zustandekommt. Das 'Lutealmaximum' besteht etwa 13 Tage und fällt in kurzer Zeit ab. Durch diesen Hormonentzug kommt es dann zur Menstrualblutung (47).

Die mittlere Östrogenausscheidung im normalen Zyklus hat BROWN (11,12) aus neun Zyklen von regelmäßig ovulierenden Frauen angegeben:

(in γ/d)	Östron	Östradiol	Östriol
Postmenstr. Minimum	2,8	0,7	4,7
Ovulations-Maximum	20,1	7,9	30,9
Luteal-Maximum	11,3	5,0	21,1

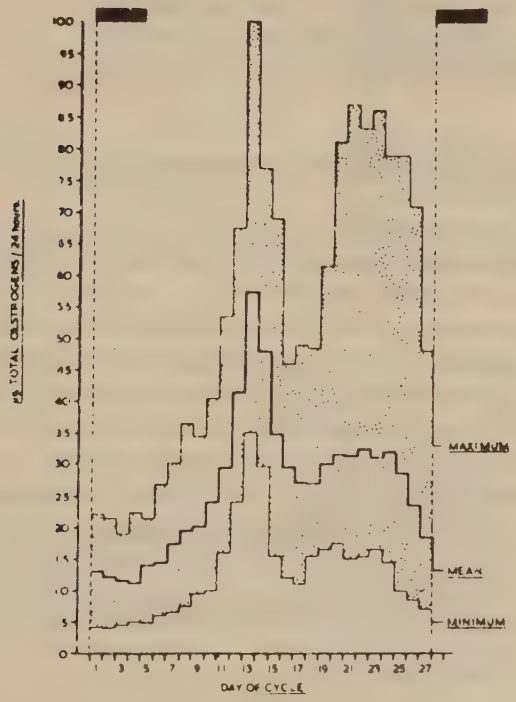


Abb.: Normale Östrogenausscheidung nach BROWN (12) aus 16 Zyklen.

KAISER (43) gibt als Mittelwert von 19 Zyklen ein Ovulationsmaximum der Gesamtöstrogenausscheidung von 31,2 ± 11,4 γ/24-Stunden-Urin an.

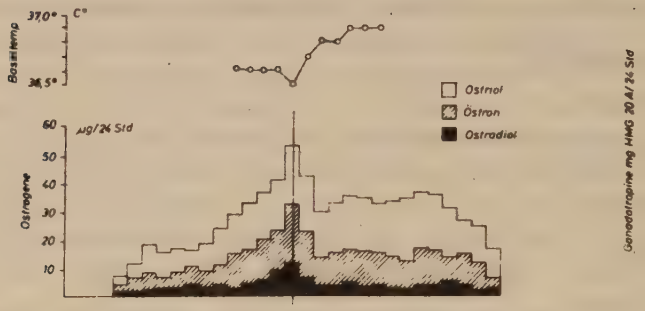


Abb.: Östrogenausscheidung im Zyklus. Mittelwertskurve aus 19 Zyklen. KAISER (43).

d) Die Östrogene im anovulatorischen Zyklus und bei Amenorrhoe.

Die beschriebene Östrogenausscheidung ist typisch für einen ovulatorischen Zyklus; sie tritt mit diesen Gipfeln nicht auf, wenn anovulatorische Zyklen ablaufen. Bei amenorrhoischen Zuständen, die durch diencephal-hypophysäre oder ovarielle Insuffizienzen bedingt sein können, fehlen diese Östrogengipfel ebenfalls, die Werte liegen knapp im mittleren Bereich oder sind stark erniedrigt. Bei einer Östrogenausscheidung von ≤10 γ Gesamtöstrogen/24-Stunden-Urin ist das Endometrium nicht mehr stimuliert, die sogenannte Blutungsschwelle ist unterschritten.

Zur Diagnose der Störungen dienen die Basaltemperaturmessung und die quantitative Östrogenmessung. Dabei werden niedrige und relativ gleichbleibende Östrogenwerte gemessen, die sich auch bei eventuellen Blutungen nicht wesentlich verändern; die Basaltemperatur weist nur geringe Höhenschwankungen auf. Als Beispiel sind ein Diagramm der Östrogenwerte eines anovulatorischen Zyklus und einer sekundären Amenorrhoe angefügt (nach BROWN,12):

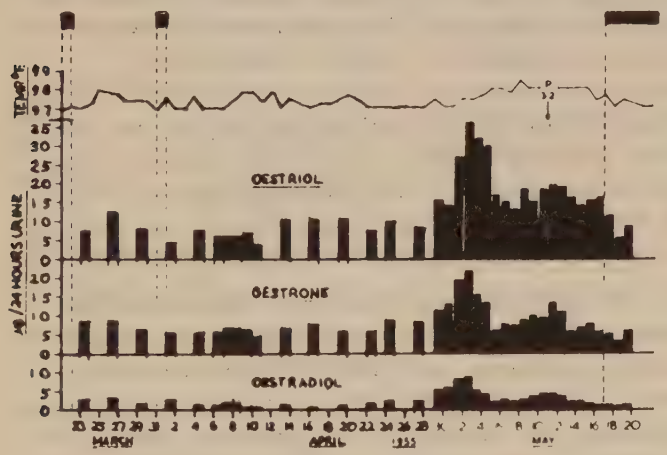


Abb.: Sekundäre Amenorrhoe (12)

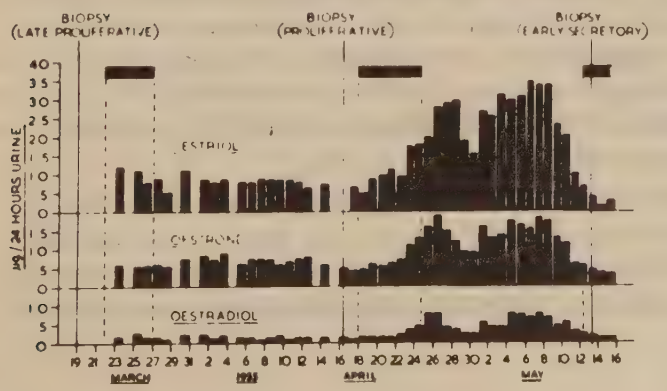


Abb.: Anovulatorische Menstruationen (12)

e) Die Östrogenausscheidung bei Gonadotropinkuren.

Nach der Entdeckung der ovarial-stimulierenden Wirkung der Gonadotropine im Tierexperiment durch ZONDEK und ASCHHEIM (62) begannen auch Versuche, Gonadotropine therapeutisch bei der Frau zur Ovulationsauslösung einzusetzen (56,25). Zur Follikelstimulierung wurde 'pregnant mare serum' (PMS) und zur Ovulationsauslösung und Luteinisierung 'human chorionic gonadotrophine' gegeben (Hamblen,35). Wiederholte Anwendungen von PMS,einem körperfremden Protein, riefen Antikörperbildung hervor, was die Wirkung beeinträchtigte. Bereits bei diesen Präparaten wurden gelegentlich Überstimulierungen in Form von großen polycystischen Ovarien mit Komplikationen wie Stieldrehung oder Ruptur beobachtet.

Wegen der AK-Bildung und auch der unzuverlässigen Wirkung von PSM und HCG bei der Frau – besonders im angelsächsischen und französischen Schrifttum erwähnt – ,wurden in den 50er Jahren menschliche Gonadotropine als FSH-Präparate verwendet.Diese können einmal direkt aus der Hypophyse stammen (Greenblatt, GEMZELL, BETTENDORF (7,9,22,33,34),oder aus dem Harn von Frauen in der Menopause, der HMG, human menopausal gonadotrophin ,eine Substanz hypophysären Ursprungs mit FSH- und LH-Aktivität enthält. (DAUME, STAEMMLER, LUNENFELD, CROOKE, 20, 24, 58)

Zwar ließen sich mit dieser Substanz weitaus bessere Ergebnisse erzielen als mit der Kombination PMS-HCG, doch trat auch eine höhere Rate von unerwünschten Nebenwirkungen auf. Diese Nebenwirkungen, wie Ovarial-

cysten, Meigs'Syndrom etc. (36) waren - wie eingangs erwähnt - nicht dosisabhängig und machten daher für die Patienten eine sorgsame klinische Überwachung notwendig.Besonderer Wert muß nun auf die laufende Östrogenkontrolle gelegt werden,da die Östrogenausscheidung nach der Stimulierung sowohl einem normalen biphasischen Zyklus ähnlich sein sollte, als auch parallel zu den verabreichten Gonadotropinen verlaufen sollte. Mit den Gonadotropinen neuerer Art werden jetzt oft weit höhere Werte erhalten als früher:

AUTOR	PRÄPARATE	HÖCHSTE ÖSTRIOLWERTE
GEMZELL (34)	12x10mg FSH 6x6000 IE HCG	2066 γ
BETTENDORF (9)	5x 1600 IE HMG	350 γ
APOSTOLAKIS (3)	9x 1600 IE HMG	300 γ
CROOKE (18)	8x500 E FSH 10x1200 IE HCG	110 γ

Die Östrogenausscheidung hat insbesondere in den Fällen ein Interesse, wo eine Gravidität durch eine Gonadotropinkur zustande kam. DAUME (siehe Einleitung) stellte auf Grund von sechs Graviditäten bei den präovulatorischen Östrogenwerten bemerkenswerte Relationen fest, die bei rechtzeitiger Kenntnis die Gefahr von Polyovulationen noch vor der Konzeption erkennen lassen.

In folgender Tabelle sind die Östrogenwerte von Graviditäten in Korrelation zum Basaltemperaturanstieg aufgeführt:

AUTOREN	PRÄPARATE	DOSIS	PRÄOVULAT. ÖSTROGENMENGE	KORREL. Z. BT-ANSTIEG	ERFOLG (GRAVIDITÄT)
BETTENDORF	HMG HCG	6500 HMG e. 11 x 5000 IE.	ca. 500 γ	2 d nach HCG-Gabe	Zwillinge (32. Woche Abort)
DAUME (23)	FSH HCG	10 x 10mg 5 x 500 IE 5 x 5000 IE	110 γ	+ 4 d	Gravidität
DAUME	HCG FSH	8 x 5000 IE 4 x 10,5mg	50 γ	- 2 d	"
DAUME	HMG HCG	11 x 1000 E 4 x 5000 IE	70 γ	- 3 d	"
DAUME	HMG HCG	13 x 1000 E 4 x 5000 IE	400 γ	- 4 d	"
DAUME	HMG HCG	10 x 1000 E 2 x 5000 IE	160 γ	- 4 d	"
GEMZELL (31)	FSH HCG	10 x 5mg 3 x 6000 IE	310 γ	- 2 d	Zwillinge
GEMZELL (31)	FSH HCG	10 x 5mg 3 x 3000 IE	800 γ	0	Vierlinge
LUNENFELD	HMG HCG	12 x 90mg HRP-HMG 6 x 5000 IE	110 γ	2 d nach HCG-Gabe	Einling
VAN DE WIELE (59)	HMG HCG	14 x 2 Amp. Pergonal 4 x 4000 IE	hoch (smear)	"	Zwillinge

3. Die quantitative Bestimmung der Östrogene im Harn.

Das bisher übliche Verfahren zur quantitativen Östrogenbestimmung ist das von BROWN aus dem Jahre 1955 (10). Diese sehr genaue Methode ist allerdings wegen ihrer langen Versuchsdauer von zwei Tagen den klinischen Erfordernissen einer Schnellbestimmung nicht gewachsen. - Mehrere Methoden zur Östrogenbestimmung sind von ITTRICH (37,38,39) angegeben worden,in denen der KOBER'Komplex (46) - gegenüber der BROWN'schen photometrischen Messung - fluorimetrisch gemessen wird. Die erste Methode erfüllt wegen des langen Aufarbeitungsganges zeitlich nicht die Erfordernisse einer Schnellmethode. Eine weitere verkürzte Methode beinhaltet dagegen Ungenauigkeiten, da durch die ungenügende Verarbeitung der Extrakte zurückbleibende Chromogene fluorimetrisch miterfaßt werden. Dadurch werden die Östrogenwerte in inkonstanter Form verfälscht.Die anerkannte Schnellbestimmung schließlich ohne Aufarbeitung des Harns kommt wegen geringer Empfindlichkeit nur für die Beurteilung von Schwangerschaften in Frage und ist für die hier gestellte Problematik zu ungenau. - Hier sollen die Nachweismethode von J.B.BROWN und die Verfahren von G.ITTRICH charakterisiert werden.

a) Methode von J.B.BROWN (10)

Sie wurde 1955 entwickelt und basiert auf der spezifischen Farbreaktion der einzelnen Östrogene bei der photometrischen Messung. Dazu muß der Harn hydrolysiert, mit Äther extrahiert und mit Puffergemischen gereinigt werden. Danach werden die übrigen phenolischen Steroide mit Benzol und Petroläther abgetrennt, die einzelnen Fraktionen mit Wasser bezw.Natronlauge extrahiert, mit Dimethylsulfat methyliert und noch-

mals gereinigt. Mit inaktiviertem Aluminiumoxyd erfolgt die Absorptionschromatographie. Die erhaltenen Eluate werden mit Hydrochinon versetzt,bis zur Trockne verdampft und mit Schwefelsäure zum KOBER-Komplex gefärbt. Mit dem Spektralfotometer wird bei jeweils verschiedenen Wellenlängen gemessen. Die Ausrechnung der Werte erfolgt nach der ALLEN'schen Formel (1).

Die Methode benötigt zwar einen großen zeitlichen und materiellen Aufwand, ist aber sehr spezifisch und gut reproduzierbar. Bis zu 95% der eingesetzten Östrogene können wiedergewonnen werden. Die Empfindlichkeit ist mit 5 γ/24-Stunden-Urin angegeben. Wegen ihrer Zuverlässigkeit und Sicherheit dient sie besonders für wissenschaftliche Untersuchungen und ist wohl die am weitesten verbreitete Methode zur quantitativen Messung der Gesamtöstrogene.

b) Methoden von G. ITTRICH aus den Jahren 1958 - 1960

Nachweisreaktion aus dem Jahre 1958 (37):

Sie ist im wesentlichen eine modifizierte Farbreaktion nach BROWN bezw. KOBER.

Nach Hydrolyse und Extraktion mit Äther erfolgt Reinigung und Destillation. Bei der Chromatografie wird das östrogenhaltige Gemisch mit Benzol und Tetrachlorkohlenstoff eluiert. Die drei Östrogenphasen werden getrennt aufgefangen und abdestilliert.Nach Zugabe von Hydrochinon-Schwefelsäurereagenz wird erhitzt und im Eis abgekühlt. Es wird mit p-Nitrophenol-chloroform gemischt, zentrifugiert und fluorimetrisch gemessen. Der Arbeitsaufwand ist etwas geringer als bei BROWN; Spezifität und Empfindlichkeit sollen sehr hoch sein.

Schnellbestimmung von 1959 (38) :

Die Methode dient zur orientierenden, summarischen Östrogenbestimmung von Werten über 1mg,kommt also nur

in der Schwangerschaft zur Anwendung. Zu diesem Zweck wird eine kleine Menge verdünnten Harnes sogleich mit Hydrochinon und Schwefelsäure versetzt, mit p-Nitrophenol-chloroform gemischt und fluorimetrisch gemessen. Für quantitative Untersuchungen der Östrogenausscheidung im Zyklus ist die Methode nicht brauchbar.

Routinebestimmung von 1960 (39)

Nach Hydrolyse, Extraktion mit Benzol-Petroläther und Reinigung mit Puffergemischen werden ätherische Auszüge hergestellt; diese werden nochmals gereinigt, mit Hydrochinon versetzt und bis zur Trockne eingedampft. Der mit Schwefelsäure gefärbte Extrakt wird erhitzt und im Eis abgekühlt. Der Auszug wird mit p-Nitrophenol-tetrabromäthan gemischt, zentrifugiert und fluorimetrisch gemessen.

Die Methode hat einen geringen Arbeits- und Materialaufwand, weist aber gegenüber der BROWN'schen Methode den besonderen Nachteil in Spezifität und Empfindlichkeit auf, da auch Chromogene miterfaßt werden (55).

c) Methode zur Schnellbestimmung des Östriols (ITTRICH, pers.Mittlg.1966)

Sie soll die Vorzüge der anderen Methoden in Zeitersparnis und Exaktheit der Ergebnisse vereinen.

Hierbei wird ein NaOH-Auszug des hydrolisierten, extrahierten und gewaschenen Urins nach Färbung und nach Mischung mit p-Nitrophenol-tetrabromäthan fluorimetrisch gemessen.- Die genaue Arbeitsvorschrift ist unten angegeben. Das Verfahren soll nach Angaben des Autors sehr spezifisch sein und den Zweck der Überwachung von Gonadotropinkuren zur Auslösung der Ovulation erfüllen.

B. Spezieller Teil

1. Spezielle Aufgabenstellung

Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, durch Methodenvergleich nachzuprüfen, ob die quantitative Östriolbestimmungsmethode von G.ITTRICH - im Vergleich zur Methode von J.B. BROWN - spezifisch genug ist, um den eingangs erwähnten klinischen Anforderungen zu genügen.

2. Material und Methodiken

Es wurden 24-Stunden-Sammelurine von vier Patientinnen aus sechs Gonadotropinkuren zur Ovulationsauslösung verwendet. Die tägliche Urinmenge wurde gemessen, der Urin in zwei Plastikflaschen umgefüllt und eingefroren. Insgesamt wurden 2 x 79 Urinproben in je einer Versuchsreihe nach der Methode von BROWN (10) und von ITTRICH (pers. Mittlg.) auf ihren Gesamtöstrogen- bezw. Östriolgehalt untersucht. Zuvor wurden Wiederfindungsversuche für jede Methode angestellt (siehe unten). Bei 15 Urinen wurden mit der BROWN'schen Methode Doppelbestimmungen durchgeführt, bei der Östriolbestimmung nach ITTRICH in 57%.

Bestimmungsmethoden der Östrogene

a) Bestimmung von Östron, Östradiol und Östriol aus dem menschlichen Urin nach BROWN (10)

Die Methode ist so bekannt, daß hier auf eine Wiedergabe der Versuchsanleitung verzichtet werden kann (siehe OERTEL 52).

b) Bestimmung von Östriol aus dem menschlichen Urin nach ITTRICH (pers.Mittlg.1966)

Die Methode wurde von ITTRICH auf Anregung von DAUME speziell als spezifische Schnellmethode besonders zur Überwachung von Ovulationsauslöserkuren entwickelt.

Versuchsvorschrift:

1. 24-Stunden-Urin mit Leitungswasser auf 1500 ml auffüllen und gut durchmischen.

2. 15ml Urin (Zyklus) bezw.Urinverdünnung (1:10,1:100 in der Gravidität) in Schliffstopfenröhrchen nach Zugabe von 2,3 ml konz.Salzsäure mischen und 1 h im Wasserbad hydrolysieren. In fließendem Wasser abkühlen.

3. Hydrolysat zu 15 ml Äthyläther in einen Schütteltrichter geben und 4 min schütteln. Wässrige Phase verwerfen. Ätherextrakt mit 5 ml gesätt.Natrium-carbonat-bicarbonatpuffer (p_h 9,5 - 10) waschen (ca,22 ml gesättgt. Sodalsg + 78 ml gesättgt. Natriumbicarbonatlsg. mischen). Waschlösung gut abtrennen. Ätherextrakt mit 5 ml Wasser gut waschen. Wasser vollständig ablassen.

4. Ätherextrakt 4 min mit genau 2 ml 0,1 n NaOH extrahieren, dann 2 min mit genau 2 ml 0,1 n NaOH extrahieren. Natronlauge sauber ablassen und vereinigen (Östriol).Die 0,1 n NaOH am Versuchstage frisch durch Verdünnen aus 1 n oder 2 n NaOH herstellen. (NaOH-Extrakte kurz zentrifugieren.)

5. Nachweisreaktion: Saubere 10 ml Schliffstopfenröhrchen,die in eine Zentrifuge passen,werden in folgender Reihenfolge mit

30 mg Hydrochinon
0,8 ml konz.Schwefelsäure
(unter Eiskühlung) 0,4 ml NaOH-Extrakt

beschickt. Es wird gemischt und 40 min in siedendem

Wasser erhitzt. (Gleichzeitig wird die Lösung von p-Nitrophenol (2%) in Tetrabromäthan (1%Äthanol) vorgekühlt).

Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches (3 min Eis) werden 1,5 ml Wasser überschichtet, es wird 3 min gekühlt, umgeschüttelt, wieder 3 min gekühlt, mit 2 ml p-Nitrophenol-Lösung in Tetrabromäthan versetzt und nach weiteren 3 min 20 sek kräftig geschüttelt. Dann wird 4 min bei 2000 U/min (3 min bei 3500 U/min) zentrifugiert und die obige wässrige Phase mit der Wasserstrahlpumpe entfernt.

6. Messung des Farbstoffextraktes am Eppendorf-Photometer (Fluoreszenz-zusatz) erfolgt bei Primärfilter Hg 546, Sekundärfilter 4 mm Og 2. Bis zur Messung werden die Röhrchen im Eisbrei verwahrt.

7. Die Werte werden zu einem Vergleichsstandard von 0,1 bis 1 µg Östriol in Beziehung gesetzt. Zu diesem Zweck wird eine alkoholische Östriollösung (zB 1ml=10µg) in einem Gläschen verdampft, der Rückstand dann in 4 ml 0,1 n NaOH gelöst; von dieser Lösung werden dann 0,4ml wie in 5.ff weiterverarbeitet.

Berechnung:

Ergibt 1γ Östriol / 0,4ml NaOH zB 70 Skt und die Urinprobe bei 10-facher Verstärkung 35 Skt, dann beträgt die Östriolmenge in dem angesetzten Harnaliquot (1,5ml):

$$\frac{1 \times 35}{70 \times 10} = 0{,}05\gamma/1{,}5\text{ml} = 50\gamma/24\text{ h}$$

8. Wiederauffindung: 1 - 10 γ Östriol nach Abdampfen des Alkohols in 15 ml Äther lösen und wie unter 3. nach Zusatz von 15 ml Wasser und 2,3 ml Salzsäure weiterverarbeiten.

Empfindlichkeit : Je nach Photometer 2-6 γ/24 h; Zykluswerte sind noch erfaßbar.

3. Ergebnisse.

a) Wiederfindungsversuche, Angaben über Erfahrungen mit den Methoden.

Die Wiederfindungsversuche beider Methoden wurden mehrmals durchgeführt. Dabei war die Wiederfindungsquote bei BROWN: 71% Östron, 53% Östradiol, 77% Östriol.
Bei der ITTRICH'schen Methode lag die Wiederfindung bei nur 50%. (Allerdings haben BECHAUTE und DEMEESTER bei ITTRICH 1960 nachgewiesen, daß die Wiederfindung bestenfalls 56% betrage; 29).

Erfahrungen mit der Methode nach BROWN:

Es können bei einem Versuchsansatz drei Proben gekocht werden. Die Arbeitsdauer ist unter gewöhnlichen Laborbedingungen zwei Tage, kann aber bei Ausnützung aller Versuchspausen auch nur 9 Stunden betragen. Die Methode verlangt mäßiges analytisches Geschick. Es werden 23 verschiedene chemische Reagenzien und, neben den gewöhnlichen Laborgeräten, ein Spektralphotometer benötigt.

Erfahrungen mit der Methode nach ITTRICH:

Die Methode enthält 7 Arbeitsgänge und kann nicht unterbrochen werden. In 4-5 Stunden können 10 Versuche gleichzeitig durchgeführt werden. Die exakte Arbeit verlangt analytisches Geschick, jedoch ist die Methode relativ leicht zu erlernen. Es werden 8 Reagenzien benötigt, ein Vakuumverdampfer, eine Zentrifuge und Fluoreszenzphotometer sind unerläßlich.

b) Vergleichswerte beider Methoden

In folgender Tabelle sind die Relativwerte von Östriol BROWN und Östriol ITTRICH aufgeführt:

1. Bauer A., 26 J., prim. Amenorrhoe
I. Kur vom 15.3.66 - 2o.4.66

	Östriol BROWN	Östriol ITTRICH
15.3.	5,0	17,5
18.3.	3,65	17,7
21.3.	2,8	13,0
23.3.	5,5	14,3
25.3.	11,0	13,5
28.3.	3,7	25,2
29.3.	2,0	25,0
30.3.	3,15	13,3
31.3.	11,2	17,0
1.4.	5,36	27,0
2.4.	20,58	50,5
3.4.	20,6	50,0
4.4.	27,0	142,0
5.4.	34,3	150,0
6.4.	189,0	200,0
7.4.	183,6	195,0
9.4.	286,1	296,0
11.4.	12,0	110,0
20.4.	19,6	34,0

Die ITTRICH'schen Werte liegen relativ um 67% höher als die BROWN'schen Werte. Wenn man die Werte entsprechend der Wiederfindung (BROWN 77%, ITTRICH 50%) auf 1oo% aufrechnet, so liegen die ITTRICH'schen Werte absolut um 171% höher.

Der größte absolute Streuwert beträgt:
BROWN : ITTRICH = 100 : 835

II. Kur vom 28.6.66 - 21.7.66

	Östriol BROWN	Östriol ITTRICH
28.6.	6,12	12,0
1.7.	12,22	13,0
4.7.	39,5	27,5
7.7.	13,4	20,0
8.7.	20,6	35,0

	Östriol BROWN	Östriol ITTRICH
9.7.	102,0	59,0
10.7.	39,0	38,0
11.7.	27,0	32,0
12.7.	29,8	23,5
13.7.	13,95	21,0
14.7.	23,1	23,5
15,7.	25,9	31,0
18.7.	63,5	63,0
21.7.	17,2	25,0

Die ITTRICH'schen Werte liegen relativ um 2% niedriger und absolut um 60% höher als die BROWN'schen Werte.
Der größte Streuwert beträgt:

BROWN : ITTRICH = 100 : 400

2. Obermüller Ch.,24 J., prim.Amenorrhoe
I. Kur vom 28.4.66 - 11.5.66

	Östriol BROWN	Östriol ITTRICH
28.4.	2,0	12,0
30.4.	2,5	17,0
2.5.	30,6	37,5
3.5.	43,0	57,0
7.5.	46,0	58,0
8.5.	41,7	100,0
11.5.	65,0	97,0

Die relativen ITTRICH'schen Werte liegen um 92% höher, die absoluten Werte um 212% höher als die BROWN'schen.
Der größte absolute Streuwert beträgt:

BROWN : ITTRICH = 100 : 385

II. Kur vom 12.7.66 - 31.7.66

	Östriol BROWN	Östriol ITTRICH
12.7.	10,6	18,0
14.7.	6,35	17,0
15.7.	7,1	13,0
16.7.	5,1	15,0
17.7.	16,9	18,0

	Östriol BROWN	Östriol ITTRICH
18.7.	16,8	24,0
19.7.	8,3	20,0
20.7.	15,2	25,0
21.7.	6,1	21,0
22.7.	5,0	21,0
23.7.	16,5	25,0
25.7.	7,1	21,0
28.7.	14,6	27,0
31.7.	10,4	22,0

Die ITTRICH'schen Werte liegen relativ um 97% höher, die absoluten um 221% höher als die BROWN'schen.
Der größte absolute Streuwert beträgt:
BROWN : ITTRICH = 100 : 600

3. Pröll G., 32 J., prim.Amenorrhoe,

Kur vom 18.4.66 - 27.4.66. Die Patientin reagierte auf die Kur ab 29.4. im Sinne einer Überstimulierung mit Ovarialcysten, die anfangs bis 3Qf unterhalb des Nabels reichten und die durch eine ausschwemmende Therapie bis Anfang Juni fast vollständig verschwanden. Am 11.6. hatte die Pat. eine Periode, eine Strichabrasio am 18.6. wies eine mangelhaft proliferierende Uterusschleimhaut nach. Die Östrogene wurden vom 5.5. - 18.5., am 1.6., 30.6. und 7.7. gemessen.

	Östriol BROWN	Östriol ITTRICH
5.5.	37,2	35,0
7.5.	22,1	28,0
9.5.	17,0	21,0
10.5.	14,45	17,0
12.5.	1,7	27,0
13.5.	7,9	12,0
14.5.	9,1	17,0
15.5.	6,2	17,0
17.5.	9,68	10,0

	Östriol BROWN	Östriol ITTRICH
18.5.	7,8	10,0
1.6.	3,62	12,0
30.6.	6,9	9,0
7.7.	9,6	15,0

Die ITTRICH'schen Werte liegen relativ um 41% höher, die absoluten um 176% höher als die BROWN'schen.
Der größte absolute Streuwert beträgt:

BROWN : ITTRICH = 100 : 2700 (am 12.5.m.E.)

4. Schneller E., 26 J.,prim.Amenorrhoe,
Kur vom 4.7.66 - 26.7.66

	Östriol BROWN	Östriol ITTRICH
4.7.	3,74	17,5
8.7.	4,89	2[illegible]
10.7.	19,8	29,5
11.7.	13,97	30,0
12.7.	27,4	48,0
13.7.	49,4	77,0
14.7.	126,0	126,0
15.7.	77,5	115,0
17.7.	129,5	135,0
19.7.	26,5	104,0
22.7.	11,2	122,0
26.7.	14,8	42,0

Die ITTRICH'schen Werte liegen relativ um 52%, absolut um 147% höher als die BROWN'schen.
Der größte Streuwert beträgt:

BROWN : ITTRICH = 100 : 1600

Im Durchschnitt der sechs Kuren liegen die ITTRICH'schen Werte relativ um 58%, absolut um 164% höher als die Werte der BROWN'schen Methode.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die mit der Östriolbestimmungsmethode von G.ITTRICH erzielten Werte können mit den Östriolwerten der Methode BROWN's verglichen werden,da diese erfahrungsgemäß gül-

tige Ergebnisse bringt; Paralleluntersuchungen bekräftigen diese Erfahrung.

So ergibt sich freilich (nach dem Aufrechnen der Werte auf 100%), daß die ITTRICH'schen Werte im Durchschnitt erheblich höher liegen als die BROWN'schen (ø 164%). Die größten Streuwerte betragen 500%, 735% und 1500%. Derartig große Divergenzen sind sicher auch auf Chromogene zurückzuführen, die individuell und quantitativ sehr verschieden sind und offensichtlich bei der Reinigung der Extrakte nicht genügend ausgeschleust werden.

Eine beträchtliche Komplikation des Versuches wird dadurch hervorgerufen, daß sich in manchen Fällen bei der Reinigung des ätherischen Extraktes mit Wasser die beiden Phasen nicht trennen lassen und der Versuch abgebrochen werden muß. Ursache sind wahrscheinlich muköse Stoffe, die bei der BROWN'schen Methode nicht auffallen.

Während der Nachweisreaktion darf keine Verzögerung eintreten, weil der NaOH-Extrakt (durch Chromogene?) überfärbt wird und die Werte verfälscht werden, wie Paralleluntersuchungen beweisen. Weiter müssen die Puffergemische genau eingestellt sein und sollen nicht länger als eine Woche benützt werden.

Die fluorimetrisch gemessenen Werte liegen alle über 9 γ/24-Stunden-Urin. Sie sind nach unseren Erfahrungen auch nicht mit Kinderurin oder sogar Wasser zu unterbieten.

Die Methode bietet allerdings viele technische Vorteile gegenüber der BROWN'schen Methode: Nach kurzer Einübung lassen sich in vier bis fünf Stunden 10 Versuche durchführen, was der klinischen Forderung nach Schnelligkeit ganz entsprechen würde. Auch der Arbeits- und Materialaufwand ist gegenüber der Methode von BROWN sehr reduziert.

5. Zusammenfassung

Die Östriolbestimmungsmethode von ITTRICH aus dem Jahre 1966 ist aus folgenden Gründen für eine ausreichende Kontrolle des Östrogenspiegels unter Gonadotropinkuren zur Auslösung der Ovulation nicht geeignet.

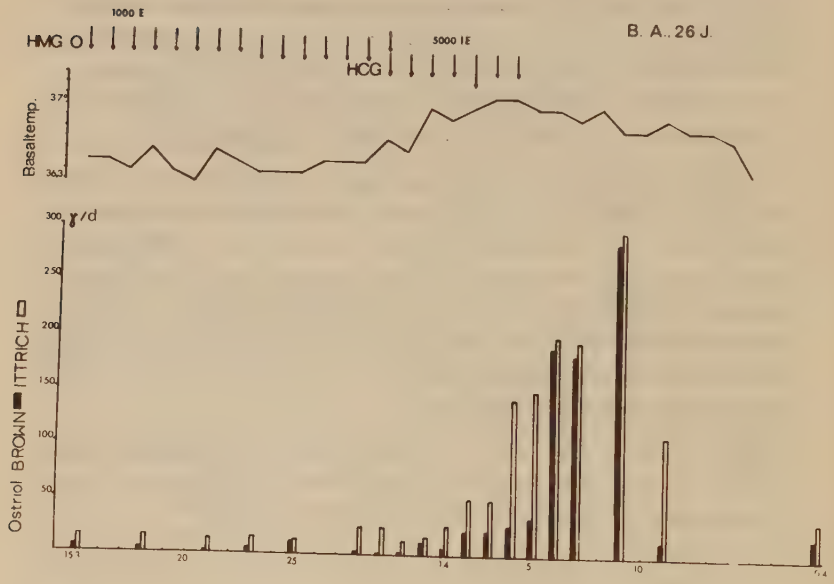
Es wurden Paralleluntersuchungen nach BROWN und nach ITTRICH zur Bestimmung des Östriols bei 79 Urinproben durchgeführt. Dabei ergab es sich, daß die Werte nach der ITTRICH'schen Methode im Durchschnitt um 164% höher liegen als die Werte nach der Methode BROWN.

Mehrere Werte nach ITTRICH liegen um 500% und mehr über denen von BROWN. Diese Ergebnisse werden durch eine zu starke und wechselnde Beeinflussung durch Chromogene, wie auch durch kaum vermeidbare unterschiedliche Versuchsgegebenheiten erhalten und spiegeln daher nicht die tatsächliche Reaktion des Ovars auf Gonadotropine wieder.- Die Methode bietet aber den Vorteil der relativ einfachen und schnellen Durchführung.

Eine schnelle und sichere Kontrolle der Östrogene bleibt daher noch abzuwarten. Mit den bisherigen Methoden kann sie nicht zufriedenstellend erreicht werden.

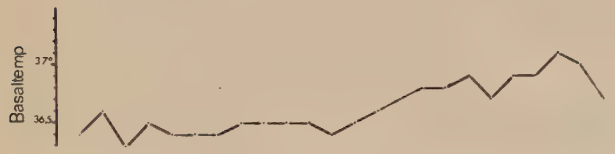
Anhang:

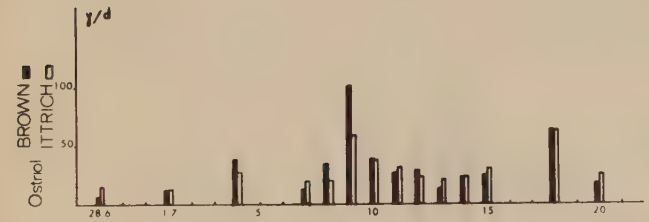
In den folgenden Diagrammen aus den Ergebnissen der sechs Kuren sind die Ostriolwerte nach BROWN und nach ITTRICH, die Basaltemperaturkurven und die Behandlungsschemata eingezeichnet.



Nr. 1: Bauer A., I. Kur

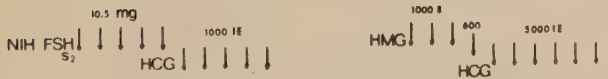
B.A.,26J.

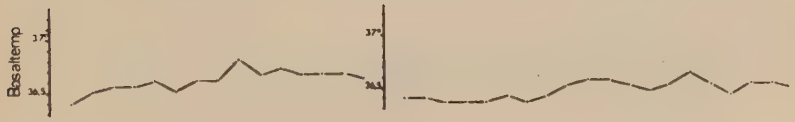


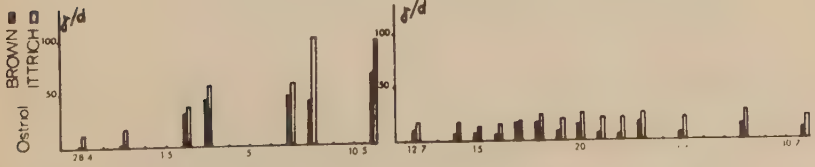


Nr.?: Ba... A.. H.r...

O Ch 24 J

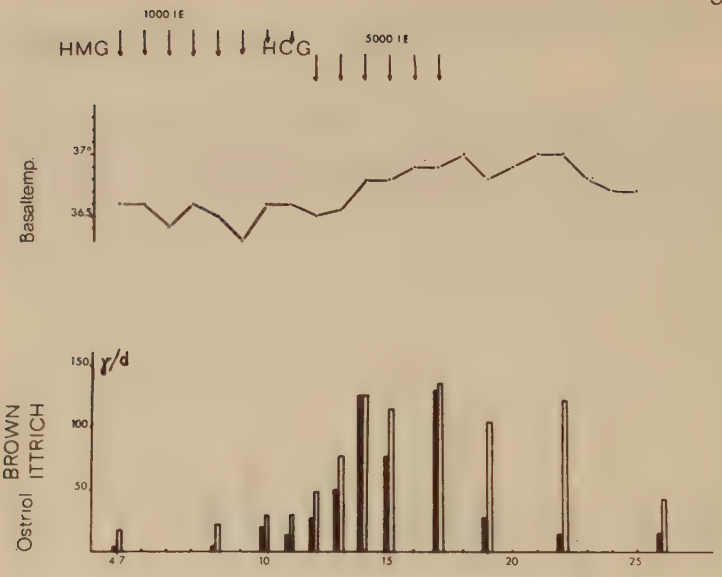






Nr.?: Obermüller Ch. Juro IT.Kur

SCH E., 26 J



Nr.4: E. Schneller

(Hyperstimulierung)

GP. 32 J

Nr.5: G. Pröll

Literaturverzeichnis

1. Allen W.M.
A simple Method for Analysing Complicated Absorption Curves, of Use in the Colorimetric Determination of Urinary Steroids
J.clin.Endocr. 1o (1950) 71

2. Apostolakis M., Bettendorf G., Voigt K.D.
Gonadotropine
Thieme Stuttgart, 1965

3. Apostolakis M., Bettendorf G., Voigt K.D.
Klinisch-experimentelle Studien mit menschlichem hypophysären Gonadotropin
Act.endocr. 41 (1962) 14

4. Bell E.T., Mukerij S., Loraine J.A., Lunn S.F.
The Relationship of Gonadotrophin Excretion to Ovulation during the Menstrual Cycle
Act.endocr. 51 (1966) 578

5. Bettendorf G.
Hypophysäres Gonadotropin. Isolierung und Überprüfung der klinischen Wirksamkeit
Habilitationsschrift 1961 Hamburg

6. Bettendorf G.
Die Regelung der Ovarialfunktion
Arztl.Forsch. 16/I (1962) 308

7. Bettendorf G.
Beeinflussung der hypogonadotropen Ovarialinsuffizienz durch hypophysäres Human-Gonadotropin
Geb.Frau 22 (1962) 928

8. Bettendorf G., Ahrens D., Grott K., Napp H.J.
Akutes Meigs-Syndrom und Graviditat nach Ovulationsauslösung mit hypophysären Gonadotropinen
Geb.Frau 27 (1967) 1281

9. Bettendorf G., Breckwoldt M.
Klinisch-experimentelle Untersuchungen mit hypophysärem Human-Gonadotropin
Arch.Gyn. 199 (1964) 423

10. Brown J.B.
A chemical Method for the Determination of Oestriol, Oestron and Oestradiol in Human Urine
Biochem. J. 60 (1955) 185

11. Brown J.B., Klopper A., Loraine J.A.
The Urinary Excretion of Oestrogens, Pregnanediol and Gonadotrophins during the menstrual Cyclus
J.Endocr. 17 (1958) 401

12. Brown J.B., Kellar R., Matthews G.D.
Preliminary Observations on Urinary Oestrogen Excretion in certain Gynaecological disorders
J.obstetr.gynaec.66/2 (1959) 177

13. Buchholz H.U.
Praktische Ergebnisse nach Depothormon-behandlung der Zyklusstörungen und der weiblichen Sterilität
Med. (1957) 148

14. Buchholz R.
Quantitative Bestimmungen der gonadotropen Hypophysenhormone im Zyklus
Geb Frau 17 (1957) 707

15. Butenandt A.
Untersuchungen über das weibliche Sexualhormon
Dt.med.Wschr.55 (1929) 2171

16. Butenandt A.
Über "Progynon", ein krystallisiertes weibliches Sexualhormon
Naturwiss.17 (1929) 879

17. Buxton C.L., Herrmann W.
Induction of Ovulation in the Human with human Gonadotrophins
Amer.J.Obstetr.Gynaec.81 (1961) 584

18. Crook A.C., Butt W.R., Palmer R.F.etal.
Clinical Trial of Human Gonadotrophins
J.Obstetr.Gynaec.Brit.Comm.71 (1964) 571

19. Crooke A.C., Butt W.R., Palmer R.F. et al.
Effects of different Preparations of Human Gonadotrophins on infertile Patients with idiopathic amenorrhoea
J.Obst.Gyn.Brit.Comm.70 (1963) 604

20. Crooke A.C., Butt W.R., Carrington S.P. et al.
Pregnancy in women with secondary Amenorrhoea treated with Human Gonadotrophins
Lancet I (1964) 184

21. Crooke A.C., Butt W.R., Bertrand P.V.
Clinical trial of Human Gonadotrophins (Variation in Sensitivy between patients and Standardisation of Treatment)
Act.Endocr. (1966) Suppl.111

22. Daume E., Dörner G.
Klinische Resultate der Amenorrhoebehandlung mit Kombination Chorion-gonadotropin und hypophysäres FSH
3.Weltkongr.Gyn.Wien 1961, p.292

23. Daume E.
Ovarialstimulierung mit tierischem hypophysären FSH-aktiven Gonadotropin
GebFrau 26 (1966) 600

24. Daume E., Kaiser R.
Hormonanalytische Untersuchungen über die Ovarial-stimulierung bei abgestufter HMG - HCG Dosierung
Arch.Gyn.202 (1965) 239

25. Davis M., Koff A.
The experimental Production of Ovulation in the Human subject
Amer.J.Obst.Gyn. 36 (1938) 183

26. Döring G.K.
Unsere Erfahrung mit der Ovulationsauslösung mit Clomiphene
Arch.Gyn.202 (1965) 185

27. Doisy E.A., Velver C.D., Thayer S.A.
Folliculin from Urine of pregnant Women
Am.J.Physiol.90 (1929) 329

28. Dworzak H., Podleschka K.
Zur hormonalen Funktion des Granulosazelltumors
Arch.Gyn.154 (1933) 441

29. Eechaute W., Demeester G.
Fluorimetric Determination of total Estrogens after Gel Filtration of Enzymatically Hydrolyzed Urine
J.clin.Endocr.25 (1965) 480

30. Fukushima M., Stevens V.C. et al.
Urinary FSH and LH Excretion during the Normal Menstrual Cycle
J.clin.Endocr.24 (1964) 205

31. Gemzell C.A.
Induction of Ovulation with Human Gonadotrophins
Proceed.of II.Intern.Congr.Endocr.London 1964,805

32. Gemzell C.A., Ross P.: Pregnancies following treatment with Human Gonadotrophins with special reference to the problem of multiple births
AmJ.Obst.Gyn.94 (1966) 490

33. Gemzell C.A., Diszfalusy E., Tillinger G.
Clinical Effect of Human Pituitary Follicle-Stimulating Hormone (FSH)
J.clin.Endocr.18 (1958) 1333

34. Gemzell C.A.
Induction of Ovulation with Human Pituitary Gonadotrophins
Fert.Ster.13/2 (1962) 153

35. Hamblen E.C.
Some Observations on the Gynecic Employment of Equine Gonadotrophins
41(1941) 495 Am.J.Obst.Gyn.

36. Hammerstein J.
Gefahren d.ovariellen Überstimulierung bei Anwendung von Clomiphen und Gonadotropinen z.Ovulationsauslösung
GebFrau 27 (1967) 1125

37. Ittrich G.
Eine neue Methode zur chemischen Bestimmung der östrogenen Hormone im Harn
Hop.Seyl.Zschr.312 (1958) 1

38. Ittrich G., Igel H.
Bestimmung der Harnöstrogene in der Schwangerschaft
Zbl.Gynaec.81 (1958) 255

39. Ittrich G.
Eine Methode zur klinischen Routinebestimmung der Harnöstrogene
Zbl.Gynaek.82 (1960) 429

40. Ittrich G.
Vergleichende Untersuchungen über den Östrogenspiegel im Blut und die Östrogenausscheidung im Harn während des Menstrualzyklus
Zbl.Gynaek.82 (1960) 1732

41. Kaiser R.
Fehler und Gefahren in der Anwendung von sexualhormonen in der Gynäkologie
Dt.med.Wschr.83 (1958) 1673

42. Kaiser R.
Nebenwirkungen und Schäden der Hormontherapie in der Gynäkologie
Fortschr.Med.81 (1963) 781

43. Kaiser R.
Die Gonadotropin- und Östrogenausscheidung in den verschiedenen Lebensabschnitten der Frau
GebFrau 26 (1966) 596

44. Kaiser R., Mackert B.,Keyl W.
Die zeitliche Korrelation zwischen den Gonadotropin- u. Östrogenmaxima u.dem Basaltemperaturanstieg im Zyklus
Arch.Gyn.199 (1964) 414

45. Karlson P.
Biochemische Wirkunsweise der Hormone
Dt.med.Wschr.86 (1961) 668

46. Kober S.
Eine kolorimetrische Bestimmung des Brunsthormons (Menformon)
Biochem.Zschr.239 (1931) 209

47. Lauritzen Ch., Diszfalusy E.
Oestrogene beim Menschen
Springer 1964

48. Liggins G.C., Ibbertson H.K.
A successful Quintuplet Pregnancy following Treatment with Human Pituitary Gonadotrophin
Lancet 1966/I,114

49. Medizinisches Periskop
Gonadotropine und Zwillinge
Ingelheim 16 (1966) 29

50. Mozes M., Bogokowsky H., Antebe E.
Thromboembolic Phenomena after Ovarian Stimulation with Human Gonadotrophins
Lancet 1965/II, 1213

51. Napp H.J., Rothe A.
Die Behandlung der Ovarialinsuffizienz mit oralen Gestagenen
Dt.med.Wschr.83 (1958) 325

52. Oertel G.W.
Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Har
Springer 1964

53. Petersohn K.L.
Die Gonadotropinausscheidung während des Menstrualzyklus und in der Menopause
Zbl.geb.Gyn.157 (1961) 296

54. Rust W.
Die Auslösung der Ovulation durch Progesteron bei den verschiedenen Formen der anovulatorischen Blutung
Zbl.Gyn.78 (1956) 1363

55. Sas M.
Klinische Anwendung der Sexualhormonbestimmungen
Zwangl.Abh.d.Frauh.Vol 23,1964

56. Siebke H.
Indikationen und Erfolge der Therapie mit Ovarial- und Hypophysenvorderlappenhormon
Klin.Wschr.(1932) 1286

57. Staemmler H.J.
Grenzen der gynäkologischen Hormontherapie
Ther.d.Gegw.100 (1961) 128

58. Staemmler H.J.
Über die Zyklusinduktion exogener Gonadotropine (PMS,HCG)
Zbl.Geb.Gyn.156 (1961) 144

59. Van de Wiele K.L., Turksoy R.N.
The Use of Human Menopausal and Chorionic Gonadotrophins in Patients with Infertility due to Ovulatory Failure
Am.J.Obst.Gyn.93 (1965) 632

60. Westman A.
The Influence of X-Irradiation on the Hormonal Function of the Ovary
Act.Endocr.29 (1958) 334

61. Zander J., Buntru G.
Stimulierung der Ovarialfunktion durch Clomiphene (MRL - 41) bei Frauen mit gestörter Ovulation
GebFrau 23 (1963) 871

62. Zondek B., Aschheim S.
Hypophysenvorderlappen und Ovarium
Beziehungen der endokrinen Drüsen zur Ovarialfunktion
Arch.Gyn.130 (1927) 1

Herrn Prof. Dr. R. Kaiser danke ich für die Überlassung des Themas meiner Arbeit und für seine freundliche Unterstützung.

Herr Dr. E. Daume hat die Laboruntersuchungen geleitet und in vielen Stunden die Ergebnisse diskutiert. Ich möchte ihm ganz besonders herzlich danken.

Fräulein Rogowski half mir liebenswürdig bei technischen Fragen.

L e b e n s l a u f

Am 2o. Oktober 1942 wurde ich, Hans Dworzak, in Eger,Böhmen, als Sohn des Gynäkologen Dr. Hans Dworzak und seiner Ehefrau Margarete geboren. Nach der Aussiedlung im Dezember 1945 lebte meine Familie bis 1951 in Thurndorf, Oberpfalz. Dort besuchte ich die Volksschule. Da mein Vater sich zu dieser Zeit in Weiden,Opf. niedergelassen hatte, zogen wir dorthin um. 1952 trat ich in das Hum. Gymnasium Weiden ein. 1954 verstarb mein Vater. Nach dem Abitur 1962 immatrikulierte ich mich an der Med. Fakultät der Universität München. 1965 bestand ich das Physikum. 1967 heiratete ich Lilo Burauen. Am 18. Dezember 1968 bestand ich das Medizinische Staatsexamen.